

CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA EDUCAÇÃO E SAÚDE
CURSO DE BIOMEDICINA

HENRIQUE FARIA FREITAS

**ESTUDO MOLECULAR DE FAMÍLIA COM SINAIS CLÍNICOS DA
SÍNDROME DE VON HIPPEL-LINDAU (VHL)**

Trabalho de conclusão de curso,
apresentado no formato de artigo científico
ao UniCEUB como requisito parcial para a
conclusão do Curso de Bacharelado em
Biomedicina, sob orientação da Profa. Dra.
Fernanda Costa Vinhaes de Lima

BRASÍLIA
2017

Estudo molecular de família com sinais clínicos da síndrome de Von Hippel-Lindau (VHL)

Henrique Faria Freitas¹

Fernanda Costa Vinhaes de Lima²

Resumo

A síndrome de Von Hippel-Lindau (VHL) é uma desordem familiar autossômica dominante hereditária. Caracterizada pelo desenvolvimento de neoplasias benignas e malignas, decorrentes de mutações no gene VHL. A síndrome é causada pela inativação da proteína VHL, sendo esse o fator responsável pelo aumento da produção de fatores de crescimento, o que explica a proliferação vascular dos tumores característicos dessa síndrome, como hemangioblastoma medular, e feocromocitoma. O objetivo deste trabalho foi realizar um estudo de caso, clínico e molecular de uma família que apresenta como caso-índice uma criança de 11 anos com feocromocitoma. Tumores derivados da síndrome de Von Hippel-Lindau, normalmente, são múltiplos e multifocais, aumentando a necessidade de acompanhamento constante dos pacientes, para avaliar a regressão ou manifestação de novos tumores. A mutação R167Q em heterozigose foi confirmada no caso-índice e em sua genitora, validando a suspeita de síndrome familiar. Outros cinco membros familiares foram pesquisados, e não apresentaram mutações.

Palavras-Chave: Síndrome de Von Hippel-Lindau (VHL). Feocromocitoma. Mutação. Brasília.

Molecular study of family with clinical signals of syndrome of Von Hippel-Lindau (VHL)

Abstract

The Von Hippel-Lindau syndrome is a hereditary autosomal dominant familial disorder. Characterized by the development of malignant and benign neoplasms resulting in mutations on VHL gene. The syndrome is caused by inactivation of VHL protein, being the reason for the increasing of the production of growth factors, which explains the proliferation of vascular tumors. The most characteristic tumors of that syndrome are: medullar hemangioblastomas; and pheochromocytoma. The objective of this research is to accomplish a case study, clinical and molecular, of a family which have as an index case an 11 years old child with pheochromocytoma. Tumors derived from Von Hippel-Lindau syndrome normally are multiple and multifocal, increasing the need of constant monitoring of these patients. The missense mutation R167Q in heterozygous was found and confirmed in the index case and in his mother. Five other members of this Family were researched and they did not present this mutation.

Key-words: Von Hippel-Lindau syndrome (VHL). Pheochromocytoma. Mutation. Brasília.

¹ Graduando do curso de Biomedicina do Centro Universitário de Brasília- UniCEUB – henrique.fariaf@gmail.com

² Professora do Centro Universitário de Brasília – UniCEUB fernanda.lima@ceub.edu.br

1. INTRODUÇÃO

O câncer, atualmente, é considerado uma das maiores causas de morte no mundo e é definido como uma doença genômica que surge a partir de alterações cumulativas no material genético (DNA) de células normais, que após uma série de transformações se tornam malignas (DANTAS et al., 2009).

As mutações gênicas são responsáveis pela maioria dos cânceres (cerca de 85%). O DNA pode ser danificado de diversas maneiras, entre elas: mutações espontâneas a partir de trocas químicas dos nucleotídeos; carcinógenos (substâncias químicas presentes no fumo, conservantes de carnes e embutidos, luz ultravioleta do sol, radiações ionizantes de fontes radioativas, bebidas alcoólicas, herbicidas, fungicidas e pesticidas utilizados na agricultura indiscriminadamente) (PRADO, 2014).

Essas substâncias carcinogênicas danificam o DNA por realizarem trocas de bases nitrogenadas durante a duplicação celular, sendo as células somáticas mais susceptíveis ao câncer por se dividirem com maior frequência, não havendo tempo para os mecanismos de reparo do DNA atuarem antes de uma nova duplicação (PRADO, 2014).

A carcinogênese é resultante de múltiplas etapas e pode envolver até centenas de genes por meio de quebras e perdas cromossômicas, amplificações gênicas, mecanismos epigenéticos ou por instabilidade genômica, os principais grupos de genes envolvidos são: proto-oncogenes, genes supressores de tumor e genes relacionados ao reparo do DNA. A partir da identificação de quais genes envolvidos em cada câncer é possível uma melhor compreensão acerca da doença, possibilitando assim, o diagnóstico precoce e melhores opções para o tratamento (DANTAS et al., 2009).

Síndromes de câncer hereditário são afecções genéticas, nas quais indivíduos de uma mesma família possuem prevalência de neoplasias malignas. Ocorrendo por transmissão vertical (de geração a geração), por meio do padrão de herança descrito por Johann Mendel (1822-1884), normalmente do tipo autossômico dominante, ou seja, o risco de transmissão para a prole é de 50% em cada gestação, independente do sexo. Apresentam elevada taxa de penetrância, isso é, o indivíduo que for portador da mutação possui grande

risco de desenvolver lesões associadas à síndrome por toda vida (DANTAS et al., 2009).

Feocromocitomas (FEOs) são tumores neuroendócrinos raros, que surgem a partir das células cromafins do sistema nervoso simpático, localizados na medula adrenal. Tumores semelhantes aos FEOs que surgem nas regiões extra-adrenais são classificados como paragangliomas (PGLs). Os feocromocitomas são caracterizados por hipertensão secundária podendo ser detectados a partir do estudo de catecolaminas no sangue e na urina. Normalmente os feocromocitomas tem apresentação esporádica, no entanto, 15-20% desses tumores estão relacionados a alguma síndrome genética (JALBANI; NAZIM; ABBAS, 2015; GHEORGHE et al., 2017).

PGLs e FEOs podem estar relacionados a algumas síndromes familiares derivadas de mutações germinativas em alguns genes como, por exemplo: os genes que codificam a enzima succinato desidrogenase (SDH) e suas subunidades (SDHA, SDHB, SDHC, SDHD), o gene RET (*rearranged during transfection*), o gene relacionado à neoplasia endócrina múltipla tipo 1 e 2 (NEM 1 e 2) e o gene da Síndrome de Von Hippel-Lindau (VHL) (PACAK et al., 2016).

A SDH está presente no complexo II da cadeia respiratória mitocondrial, com o papel de oxidar o succinato em fumarato no ciclo de Krebs de forma a prevenir possíveis reações danosas de espécies reativas de oxigênio. Suas subunidades SDHA (flavoproteína, 70kDa) e SDHB (proteína de ferro-enxofre, 27kDa) são hidrofílicas envolvidas no substrato realizando as ligações, oxidações e transferências de elétrons, enquanto as proteínas SDHC (cybL, 15kDa) e SDHD (cybs, 12kDa) são hidrofóbicas e possuem um sítio de ligação para ubiquinases (BARBARA; STRATAKIS, 2011).

Mutações germinativas no proto-oncogene RET predisõem a duas síndromes autossômicas dominantes: NEM2A – Neoplásia Endócrina Múltipla do tipo 2A e NEM2B – Neoplasia Endócrina Múltiplas do tipo 2B. Ambas apresentam predisposição ao desenvolvimento de FEO e Carcinoma Medular de Tireóide (DAHIA, 2014). Segundo Siqueira (2014), as síndromes estão relacionadas às mutações de ganho de função no gene RET, no entanto a penetrância do gene e suas variantes ainda são pouco esclarecidas.

Entre as síndromes genéticas estudadas que podem levar a manifestações tumorais, está a síndrome de Von Hippel-Lindau (VHL). De acordo com Ben-Skouronek e Kozaczuk (2015) a síndrome de VHL é uma desordem genética hereditária autossômica dominante de rara manifestação associada à mutação dos dois alelos do gene VHL localizado na região 3p25-26.2. Atualmente já foram confirmadas mais de 150 mutações responsáveis pelo desenvolvimento dessa síndrome familiar. Possui incidência de aproximadamente 1/36.000 nascimentos, com penetrância superior a 90% em pacientes com mais de 60 anos de idade (BEN-SKOURONEK; KOZACZUK, 2015; WONG et al., 2016).

A doença carrega esse nome em homenagem ao oftalmologista alemão Eugen von Hippel, que descreveu e identificou manifestações características na retina, e ao patologista sueco Arvid Lindau, que identificou a ocorrência concomitante de hemangioblastoma da retina e cerebelar com tumores viscerais e cistos em outros órgãos. Seu diagnóstico clínico pode ser realizado pela detecção de um tumor único típico ou histórico familiar positivo para doença (GLÄSKER et al., 2015).

É uma síndrome familiar genética causada pela mutação de um gene supressor tumoral (gene VHL) o que leva à inativação da proteína VHL (pVHL) que regula negativamente a produção de fatores angiogênicos. Ao sofrer mutação, o gene não produz proteínas VHL, que possuem conexão direta com os Fatores Indutores de Hipóxia (HIF). Devido à ausência dessas proteínas funcionais, ocorre um aumento dos HIF o que causa aumento na produção de Fatores de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF), Fatores de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF) e Fatores de Crescimento Tumoral (TGF- α). Esse fato explica o crescimento celular e a proliferação de vasos microvasculares. Além disso, HIF contribui para a superprodução de tirosina hidroxilase e catecolaminas nos feocromocitomas, sendo a causa da inibição de apoptose das células da crista neural e desenvolvimento dos feocromocitomas e paragangliomas (IWONA; SYLWIA, 2015).

A síndrome de Von Hippel-Lindau foi classificada, e dividida em dois tipos, dependendo do risco de desenvolvimento de feocromocitoma, de acordo com a tabela 1.

Tabela 1 - Classificação da síndrome de Von Hippel-Lindau.

VHL tipo 1 (Sem feocromocitoma)	Hemangioblastoma na retina Hemangioblastoma no Sistema Nervoso Central (SNC) Carcinoma de células renais (evidenciado)
VHL tipo 2 (Com feocromocitoma)	Tipo 2a – Feocromocitoma, hemangioblastoma na retina, hemangioblastoma no SNC e tumor nas ilhotas pancreáticas Tipo 2b - Feocromocitoma, hemangioblastoma na retina, hemangioblastoma no SNC, tumor nas ilhotas pancreáticas, carcinoma de células renais evidenciado Tipo 2 C – Feocromocitoma
Policetemia de Chuvash	Inativação do gene VHL

Fonte: adaptada de IWONA e SYLWIA (2015).

O feocromocitoma possui um amplo espectro de apresentações clínicas, podendo variar entre cefaléia, palpitação eipersudorese que são as manifestações mais comuns, tendo como principal característica a hipertensão sustentada ou paroxística. Outros sintomas do tumor são palidez, tremor, ansiedade, hipotensão ortostática e síncope, assim como dor torácica, arritmias, hipertrofia cardíaca, e cardiomiopatia que pode progredir para insuficiência cardíaca (COSTA; GOMES, 2008; PEREL, 2014).

Para Parenti e colaboradores (2012), a ressecção cirúrgica é a base para o tratamento dos FEO/PGL, pois tem como objetivo a remoção total do tumor primário e, quando possível a ressecção das metástases. As cirurgias desses tumores apresentam risco elevado devido à possível liberação de catecolaminas durante o processo cirúrgico, mesmo em pacientes com a pressão sanguínea estabilizada. Entretanto para o bloqueio dos efeitos da hipersecreção de catecolaminas, foi estabelecido que todos os pacientes com o tumor bioquimicamente ativo devem receber um tratamento pré-operatório específico (PACAK, 2007; ULLRICH, 2014).

Por ser uma síndrome genética de extrema complexidade, o diagnóstico de qualquer um dos tumores característicos, principalmente em crianças, é um forte indicativo para que o paciente e seus membros familiares confirmem o

diagnóstico genético através de análises moleculares e recebam o devido acompanhamento médico provendo melhor prognóstico da doença e maior sucesso no tratamento de malignidades (BEN-SKOURONEK; KOZACZUK, 2015).

Em casos de histórico familiar de mutações, é possível identificar por meio da análise molecular do líquido amniótico ou das vilosidades coriônicas a presença de mutação durante o período pré-natal. O acompanhamento e aconselhamento genético devem ser oferecidos aos pacientes e suas famílias. A expectativa média de vida é estimada em 49 anos, mas o tratamento e o acompanhamento precoce reduzem os índices de morbidade e mortalidade. Uma vez que uma mutação no gene VHL é identificada em uma família é recomendado que os testes genéticos sejam realizados em outros membros da família mesmo não tendo histórico entre eles, ou mortes anteriores ao início dos sintomas (NIELSEN et al., 2016).

O presente estudo teve como objetivo realizar um estudo de caso, clínico e molecular, de uma família que apresenta como caso-índice uma criança de 11 anos com feocromocitoma. Foi investigado aspectos clínicos, bioquímicos e moleculares do caso-índice, dos parentes de primeiro grau, e dos de segundo grau.

2. METODOLOGIA

Foi realizado um estudo observacional, com componente descritivo e analítico. O componente descritivo foi fundamentado na revisão de dados clínicos provenientes do histórico clínico e familiar e do prontuário do caso-índice atendido no ambulatório de Endocrinologia das Gônadas e Adrenais do Hospital Universitário de Brasília (HUB). Já o componente analítico inclui a realização de estudo genético-molecular do gene VHL.

Este projeto foi aprovado sob o número 061/12 pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília (UnB). Todos os sujeitos participaram da pesquisa mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Em outubro de 2015, um paciente de 11 anos foi atendido pela primeira vez no HUB, com histórico de crises de cefaléia há um ano, hipertensão arterial, sudorese excessiva desde 1 ano de vida e enurese noturna.

O paciente foi medicado e liberado, no entanto, no mesmo dia o paciente voltou direto para emergência apresentando enxaqueca e crise hipertensiva (144x122mmHg/188x153mmHg/220x150mmHg/194x158mmHg/183x143mmHg), a equipe de emergência suspeitou de feocromocitoma e solicitou catecolaminas urinárias e tomografia de abdome. O resultado das normetanefrinas urinárias foi de 6004,4µg/24h (Valor de Referência - VR: até 390µg/24h) e na tomografia computadorizada (TC) de abdome foi evidenciada lesão heterogênea de calcificação central em adrenal esquerda, de 6,1x4,2cm, compatível com feocromocitoma.

O histórico familiar do paciente foi descrito desta forma: mãe com histórico de 2 abortamentos espontâneos; tia materna falecida aos 29 anos devido à tumor cerebral; tia materna falecida aos 32 anos devido hipertensão maligna; prima materna falecida aos 20 anos devido á tumor cerebelar; avô materna falecida devido a um câncer nos rins e avô materno falecido aos 44 anos devido à acidente vascular cerebral (AVC) e hipertensão arterial sistêmica (HAS).

Foi prescrito nitroprussiato para hipertensão e o paciente apresentou melhora significativa, e continuou sendo acompanhado pelos médicos do Hospital da Criança de Brasília.

A adrenalectomia esquerda foi realizada em 11 de novembro de 2015 (cerca de 20 dias após a entrada na emergência), o paciente evoluiu com picos hipertensivos no pós-operatório imediato, após alguns meses o paciente evoluiu normotenso e sem uso de anti-hipertensivos, com as catecolaminas e metanefrinas de controle dentro dos valores de referência.

Após a confirmação do feocromocitoma, foi iniciado o estudo de caso, clínico e molecular, do caso-índice e de sua mãe através da parceria do Centro Universitário de Brasília (UniCEUB) junto à Universidade de Brasília (UnB) e o Hospital Universitário de Brasília (HUB).

O DNA genômico foi obtido a partir de leucócitos do sangue periférico por meio de punção intravenosa de 12 a 16mL de sangue em 4 tubos contendo anticoagulante EDTA. A extração do DNA foi realizada pelo método *salting out*

adaptado de John e colaboradores (JOHN et al., 1991), com o kit de extração de DNA (Qiagen). Para avaliar a quantificação de pureza do DNA extraído foi utilizado o espectrofotômetro NanoVue Plus (GE Elettronics), que quantifica ácidos nucleicos à um comprimento de onda de 260nm (valor para quantificação padrão de DNA do espectrofotômetro NanoVue Plus). A pureza do DNA pode ser avaliada pela razão entre a quantificação ao comprimento de onda de 260nm a 280nm (que corresponde à absorbância para proteínas). A razão das amostras analisadas foi superior a 1,9 na concentração de 50ng/μL, validando a pureza e qualidade da amostra analisada.

Para a amplificação do gene VHL o DNA genômico foi utilizado como substrato, por reação de polimerização em cadeia (PCR), utilizando-se pares de oligonucleotídeos iniciadores (primers) específicos. Primers para amplificação do gene VHL:

- 1F 5' CCATCCTCTACCGAGCGCGCG 3'
- 1R 5' GGGCTTCAGACCGTGCTATCG 3'
- 2F 5' CTTTAACAACCTTTGCTTGTCCCGATA 3'
- 2R 5' GTCTATCCTGTACTTACCACAACAAC 3'
- 3F 5' CTGAGACCCTAGTCTGCCACTGAGGA 3'
- 3R 5' CAAAAGCTGAGATGAAACAGTGTA 3'

Para confirmar a amplificação do fragmento de interesse, os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% corados com brometo de etídio (0,5μg/mL), visualizados sob luz ultravioleta e fotografados. Os produtos da amplificação foram purificados pelo Kit Qiaquick (Qiagen) e enviados para o sequenciamento automático pelo método de Sanger por uma empresa especializada: Macrogen Inc. (Seoul, Coréia do Sul), utilizando os sequenciadores ABI3730XL e ABI3700 (Applied Biosystems). Análise, alinhamentos e comparações entre as sequências foram realizadas com o auxílio do software Sequencher v.5.0 ou 6.0 (Gene Codes Corporation).

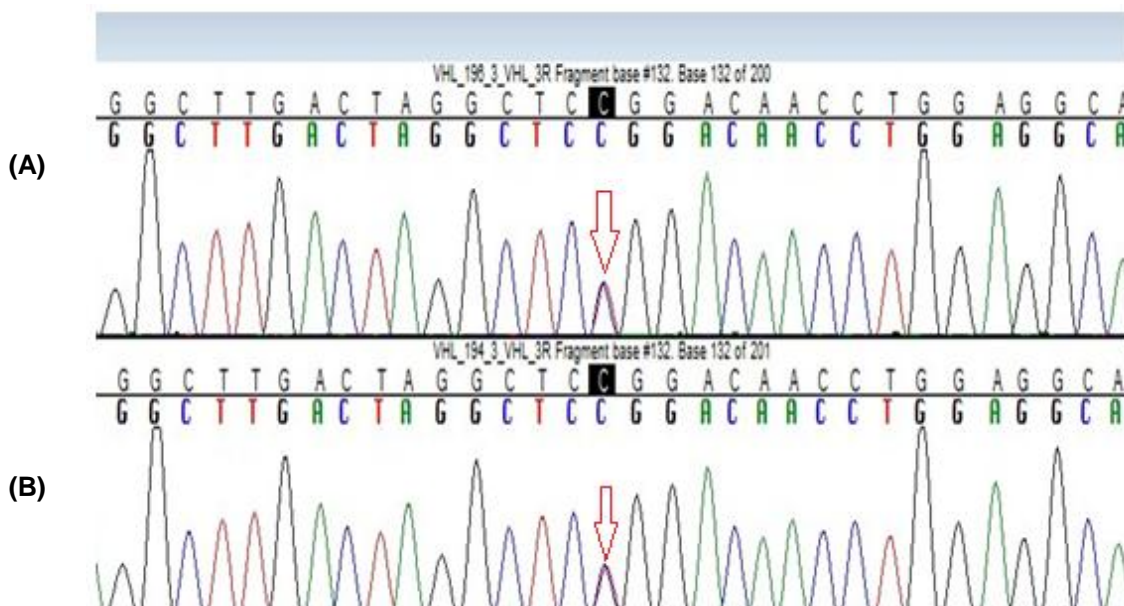
Os estudos moleculares foram realizados no Laboratório de Farmacologia Molecular (FARMOL) da Faculdade de Ciências da Saúde - UnB. O serviço de sequenciamento automático foi realizado por uma empresa terceirizada prestadora de serviços localizada na Coréia do Sul.

3. RESULTADOS

Os resultados obtidos nessa pesquisa confirmaram a mutação genética *missense* R167Q em heterozigose no caso-índice (III.23) e em sua mãe (II.13) (Figura 1). O histórico familiar materno foi confirmado a partir do sequenciamento genético pelo método de Sanger, sendo a mãe do caso-índice portadora da mutação e não apresentava até o término deste estudo nenhum sintoma, devendo ser acompanhada periodicamente para evitar agravos da doença.

No trabalho realizado por Peter e colaboradores (2009) foi possível descrever muitas das mutações que já foram descritas em várias regiões do gene VHL, entre outras que estão sendo descobertas ou que ainda não se tem conhecimento. A mutação identificada no caso-índice e sua genitora é descrita como rs5030821 (Figura 1). Com a confirmação da mutação genética na mãe e no filho, é possível afirmar a existência dessa síndrome familiar e associar essa mutação com a manifestação clínica do paciente que aos 11 anos apresentou feocromocitoma e segue em tratamento.

Figura 1: Confirmação da mutação genética no sentido reverse no caso-índice e na mãe do caso-índice pelo programa *Sequencher*. Mutação localizada na base 132 do éxon 3 do gene VHL, ocorrendo uma substituição de uma citosina por guanina.

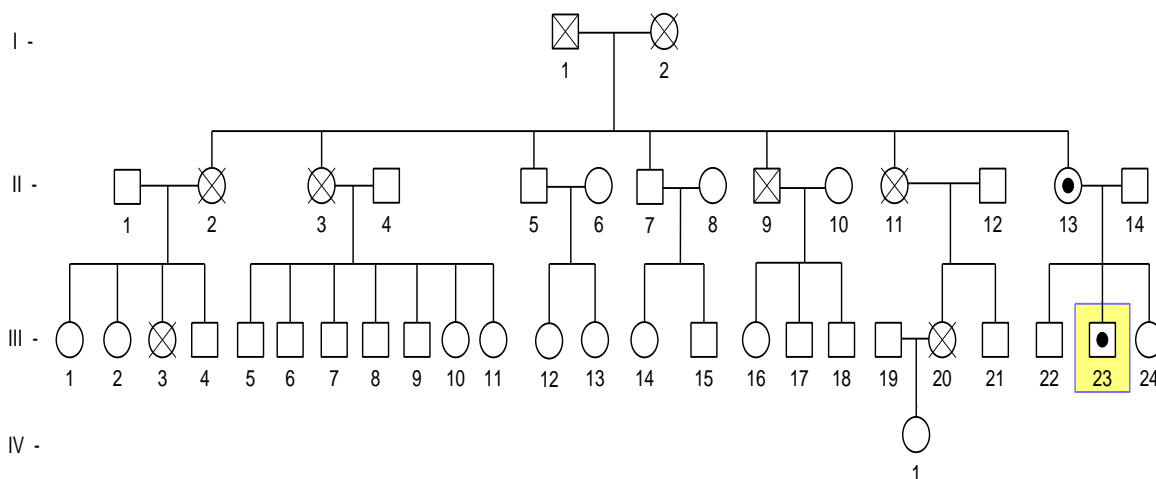


(A) Mutação encontrada no caso-índice. (B) Mutação encontrada na mãe do caso-índice (ambas identificadas por uma seta vermelha). Fonte: elaborado pelo autor.

A princípio, a mutação foi confirmada apenas no sentido reverso, sendo necessária a confirmação no sentido *forward* para que o diagnóstico fosse definitivo. Os pares de oligonucleotídeos iniciadores quando estão muito próximos da região codificante da mutação, podem levar a um sequenciamento inespecífico. Por esse motivo, foram desenhados novos pares de oligonucleotídeos iniciadores (3F 5' GGGGCCATCAGCATAACACA 3' e 3R 5' AGCAATGGTGCCTATTTTACTCT 3') pelo software Primer Blast (NCBI) para que a mutação fosse confirmada no sentido *forward*, confirmando o resultado já obtivo no sentido reverso do filamento amplificado.

A mutação foi confirmada no sentido *forward*, tanto no caso índice como em sua mãe. Com isso, foi iniciado o estudo molecular de outros membros familiares que tinham contato com a família. Os pacientes dessa família estão representados no heredograma abaixo por: III.21, III.22, III.24 e IV.1 (Figura 2). O paciente III.21 tem 14 anos de idade e apresenta quadros de cefaléia, os pacientes III.22 e III.24 são, irmão, e irmã do caso-índice e possuem 8 e 18 anos respectivamente, ambos relataram crises de cefaléia. A paciente IV.1 possui 2 anos de idade e foi considerada hígida.

Figura 2: Heredograma da família do caso-índice (III.23). Nos pacientes III.23 e II.13 foi identificada mutação do gene VHL.



Fonte: elaborado pelo autor.

Todos os procedimentos estabelecidos na metodologia foram aplicados em cada um desses novos pacientes. Após a realização de todos os procedimentos da metodologia foi possível confirmar que os pacientes III.21, III.22, III.24 e IV.1 não possuem nenhuma mutação genética relacionada a síndrome de Von Hippel-Lindau.

4. DISCUSSÃO

Mutações nas linhagens germinativas do gene VHL já são identificadas e descritas em todo o mundo com relatos em várias etnias, sendo apresentadas nos trabalhos de Emma e colaboradores (2007), Peter e colaboradores (2009), Narendranath e colaboradores (2015), entre outros. Sendo um supressor tumoral, o gene VHL regula negativamente a produção de VEGF, PDGF e IGF-II, por desestabilizar suas moléculas de mRNA. Quando o gene VHL não é expresso, a produção de proteínas pelo VEGF aumenta, promovendo angiogênese e vasculogênese. Devido a esse fator, os tumores associados ao VHL são normalmente bem vascularizados (YAN et al., 2013).

A promoção de angiogênese e vasculogênese a partir da mutação desse gene supressor tumoral (VHL) é o que possibilita o surgimento de tumores múltiplos e espalhados por todo corpo ao longo da vida, podendo dificultar o tratamento e recuperação desses pacientes. Por isso, o acompanhamento e rastreamento dessa síndrome é imprescindível mesmo em pacientes que tiveram remissão dos tumores.

Feocromocitomas podem manifestar diferentes sintomas dependendo da quantidade de catecolaminas excretadas, incluindo, hipertensão, arritmias cardíacas, dor de cabeça e palpitações. Contudo, as manifestações clínicas desses tumores são bem variáveis e inespecíficas, apenas 30% dos feocromocitomas manifestam os típicos sintomas da doença, os outros 70% variam entre assintomáticos ou sintomáticos com diferentes manifestações (YANG et al., 2016).

A síndrome de Von Hippel-Lindau é uma doença extremamente complexa de ser estudada e de difícil diagnóstico clínico devido ao envolvimento de vários órgãos. A identificação precoce das neoplasias ajuda a

diminuir a morbidade dessa doença, sendo os exames de imagem extremamente importantes para a identificação do tamanho, local, e atividade dessas neoplasias, a partir de ultrassom (US), tomografia computadorizada (TC), e ressonância magnética (MRI). A identificação e ressecção desses tumores devem ser realizadas o mais rápido possível para melhores chances de sobrevida dos pacientes (PELIN et al., 2017).

É de extrema importância para a vida dos pacientes ter a confirmação dessa mutação, pois isso pode influenciar nos hábitos de vida desses pacientes como na decisão de ter ou não filhos devido às chances dessa característica hereditária poder ser transmitida para sua prole. Com essa confirmação, é possível prover melhor prognóstico da doença e garantir melhor qualidade de vida para as pessoas que possuem essa e outras síndromes familiares (SCHMID et al., 2014).

Atualmente já foram descobertas mais de 150 mutações responsáveis pelo desenvolvimento dessa síndrome. De acordo com o estudo realizado por Narendranath e colaboradores (2015) foi confirmada em pelo menos 15 famílias indianas algum tipo de mutação no gene VHL, ressaltado a importância do diagnóstico para essas famílias.

Outros autores realizaram estudos mais recentes os quais confirmaram mutações aleatórias em várias gerações familiares, em todas elas, quando o diagnóstico dos tumores e da mutação foram tardios, os pacientes tiveram maiores dificuldades no tratamento e alguns deles foram a óbito (JALBANI; NAZIM; ABBAS, 2015; NORA et al., 2016; PELIN et al., 2017).

Um estudo realizado na Índia concluiu a análise genotípica e fenotípica da síndrome de Von Hippel-Lindau confirmando a mutação em 15 famílias. Os pacientes variavam entre 5 e 66 anos de idade, com heterogeneidade entre homens e mulheres, e todos tiveram alguma manifestação de cistos ou de tumores relacionados a síndrome familiar (NARENDRANATH et al., 2015).

Na Romênia foi realizado outro estudo que apresentava como caso-índice uma criança com manifestação maligna de feocromocitoma. Uma menina de 3 anos de idade apresentou tumor na parte direita da adrenal com cistos e regiões necrosadas. Foi confirmada a partir de exames moleculares uma mutação em heterozigose no éxon 3 do gene VHL c 244 C>G (p. Arg 82 gly). Essa mutação é diferente da encontrada no presente estudo de caso,

entretanto, as manifestações clínicas são parecidas. Essa paciente possuía histórico familiar com mãe manifestando feocromocitoma bilateral aos 18 anos de idade e aos 32, recebeu o diagnóstico de angioma cerebral (GHEORGHE et al., 2017).

Estudos moleculares foram realizados em pacientes na Hungria com feocromocitomas aparentemente esporádicos e em famílias com VHL. Entre as 7 famílias estudadas e 35 pacientes analisados foram encontradas as seguintes mutações: L158V (Família A); R161X (Família B); deleção do éxon 3 (Família C); deleção do éxon 2 (Família D); 354_355delCT (Família E); R167Q (Família F); e S80I (Família G). Os pacientes da Família A eram duas crianças que apresentavam hemangiomas na retina. Os casos-índice das Famílias B e C eram jovens que não apresentavam sintomas ou manifestações clínicas da síndrome de Von Hippel-Lindau. Na Família D, o caso-índice possuía severas manifestações da doença, entre elas, hemangioma com apresentação frequente de hemorragia na retina. O caso-índice foi o único paciente que realizou estudos moleculares na Família E, e apresentou uma deleção (354-355delCT) no éxon 2, tal mutação, ainda não havia sido descrita na literatura. O caso-índice da Família F, assim como a sua mãe, possuíam a mesma mutação do estudo de caso da presente pesquisa (Mutação R167Q), em heterozigose, ambos com manifestação clínica da síndrome VHL. Na família G foi encontrada a mutação S80I no caso-índice, assim como em outros cinco membros dessa família, entre eles, 2 eram clinicamente saudáveis (PETER et al., 2009).

Tendo em vista esse estudo realizado na Hungria com 7 famílias com diferentes tipos de mutações do gene VHL, é importante ressaltar que os feocromocitomas possuem uma frequência de 30% em pacientes com a síndrome VHL, valor similar com a pesquisa realizada, o que confirma a importância de relacionar o achado de feocromocitoma com a síndrome de VHL.

Uma análise retrospectiva foi realizada por Emma e colaboradores (2007) em 181 pacientes que apresentavam casos isolados de hemangioblastoma, dentre 188 pacientes analisados no total. Foram realizados estudos moleculares em todos os 188 pacientes, entre eles 99 homens e 89 mulheres, para confirmar o diagnóstico. Apenas em 7 pacientes dessa

pesquisa foram confirmadas mutações no gene VHL. Um paciente do sexo masculino de 40 anos de idade foi o único que manifestava feocromocitoma além de hemangioblastoma e teve a confirmação da mesma mutação do caso-índice do presente estudo - R167Q, o paciente possui histórico de hemangioblastoma e angioma da retina aos 18 anos e o histórico familiar não foi informado.

A partir dessa análise realizada por Emma e colaboradores, podemos concluir que o surgimento isolado de hemangioblastomas não está necessariamente relacionado à síndrome. Entretanto, a presença de hemangioblastomas com outros tumores descritos na tabela 1 confirma o diagnóstico da doença, sendo importante realizar estudos moleculares para rastreamento e acompanhamento da família desses pacientes.

A partir das revisões bibliográficas analisadas e da realização desse estudo, foi possível observar a extrema importância da associação das manifestações clínicas de pacientes principalmente com feocromocitomas, paragangliomas e hemangioblastomas com possíveis mutações no gene VHL.

A síndrome de VHL normalmente se manifesta pela apresentação de tumores múltiplos e multifocais, isso ocorre devido à função reguladora de angiogênese e de fatores de crescimento desse gene supressor tumoral. A presença desses tumores aumenta ainda mais a importância de acompanhar os pacientes diagnosticados com a síndrome familiar e o rastreamento e acompanhamento dessas famílias.

Tendo em vista essas representações clínicas e moleculares de outras famílias de diversos lugares do mundo, manifestando diversas mutações do mesmo gene VHL, é importante o incentivo às pesquisas que possam ajudar no diagnóstico dessas doenças, servindo como base de estudo para que outros pesquisadores possam aprofundar e relatar cada vez mais os conhecimentos sobre a genética e suas formas de manifestação e possíveis mutações.

5. CONCLUSÃO

Os achados clínicos do feocromocitoma e outros tumores associados à síndrome de Von Hippel-Lindau e outras síndromes, são informações relevantes para o diagnóstico de síndromes de alta complexidade. A partir da

confirmação de feocromocitoma no paciente deste estudo de caso, foi possível iniciar a pesquisa molecular. Confirmando a mutação no caso-índice e em sua mãe foi possível constatar que os outros parentes não possuíam a mutação.

Muitas vezes os pacientes portadores de alguma mutação genética que leva à manifestação de tumores não possuem condições financeiras para realizar estudos moleculares ou mesmo o seu país ou cidade não possui tecnologia suficiente.

A partir do material bibliográfico utilizado para realizar esta pesquisa, e dos resultados obtidos, é possível afirmar que a síndrome de von Hippel-Lindau pode apresentar feocromocitomas malignos em idades muito precoces, e de maneira mais agressiva, principalmente em crianças. Em alguns casos é necessário o monitoramento multidisciplinar dos pacientes por toda a vida, devido às chances de ocorrer possíveis metástases ou outras lesões neoplásicas.

Sendo assim, o diagnóstico é de extrema importância para o paciente e toda sua família, possibilitando o início precoce do tratamento, o que aumenta as chances de recuperação e preserva a qualidade de vida desses pacientes e seus familiares.

Portanto, a importância desta e de outras pesquisas que buscam fornecer diagnósticos definitivos a partir das suspeitas clínicas, é imprescindível para levar ao paciente maior qualidade e expectativa de vida.

6. REFERÊNCIAS

BARBARA, P.; STRATAKIS, C. A. SDH mutations in tumourigenesis and inherited endocrine tumours. **Journal of Internal Medicine**, Oxford, v. 266, n.1, p.19-42, Jul. 2009.

BEN-SKOURONEK, I.; KOZACZUK, S. Von Hippel-Lindau Syndrome. **Hormone Research in Paediatrics**, Basel, v. 84, n.3, p.145-152, sep. 2015.

COSTA, L.; GOMES, A. T. Feocromocitoma. **Arquivos de Medicina**, Porto, v. 22, n. 6, p. 177-187, Out./Dez. 2008.

DAHIA, P. L. Pheochromocytoma and paraganglioma pathogenesis: learning from genetic heterogeneity. **Nature Reviews Cancer**, San Antonio, v.14, n.2, p.108-119, jan. 2014.

DANTAS, E. L. R. et al., Genética do câncer hereditário. **Revista Brasileira de Cancerologia**. Juazeiro do Norte, v.55, n.3, p.263-269, Dez. 2014.

EMMA, R. W. et al. VHL mutation analysis in patients with isolated central nervous system haemangioblastoma. **Brain**, Oxford, v.130, n.3, p. 836-842, Jan. 2007.

GHEORGHE, P. et al. A malignant pheochromocytoma in a child with Von Hippel-Lindau mutation. **Clujul Medical**. Cluj-Napoca, v.90, n.3, p.356-358, Jul. 2017.

GLÄSKER, S. et al. Von Hippel-Lindau syndrome. **Endotext**. South Dartmouth, v.1 n.1, p.1-9, Jul. 2012.

JALBANI, I. K.; NAZIM, S. M.; ABBAS, F. Pheochromocytoma associated with von Hippel-lindau disease in a Pakistani Family. **Urology Annals**, Mumbai, v.7, n.1, p.120-123, Jan./mar. 2015.

NARENDRANATH, V. et al. Genotype–phenotype analysis of von Hippel–Lindau syndrome in fifteen Indian families. **Familial Cancer**. Kochi, v.14, n.4, p.585-594, Maio. 2015.

NIELSEN, S. M. et al. Von Hippel-Lindau Disease: Genetics and Role of Genetic Counseling in a Multiple Neoplasia Syndrome. **Journal of Clinical Oncology**. Alexandria, v.34, n.18, p.2172-2181, Jun. 2016.

NORA, L. et al., Diagnostic reevaluation of 17 cases of pheochromocytoma – a retrospective study. **Journal of Morphology and Embriology**. Cluj-Napoca. v.57, n.2, p. 651-661. Jul. 2016.

PACAK, K. Preoperative management of the phrocromocytoma patient. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**. Oxford, v.92, n.11, p.4069-4079. Nov. 2007.

PACAK, K. et al., Are patients with hormonally functional phaeochromocytoma and paraganglioma initially receiving a proper adrenoceptor blockade? A restrocpective cohort study. **Clinical Endocrinology**. Oxford, v.85, n.1, p.62-69. Jul. 2016.

PARENTI, G. et al., Updated and new perspectives on diagnosis, prognosis, and therapy of malignant pheocromocytoma/paraganglioma. **Journal of oncology**. Florence, v.2012, n.1, p.1-10. Jun. 2012.

PELIN, A. et al., A Family with Von Hippel-Lindau Syndrome: The Findings of Indium-111 Somatostatin Receptor Scintigraphy, Iodine-123 Metaiodobenzylguanidine Scintigraphy and Single Photon Emission Computerized Tomography. **Molecular Imaging and Radionucleotide Therapy**. Ankara, v. 26, n.1, p. 38-42, Fev. 2017.

PEREL, C. Feocromocitoma. **Insuficiencia Cardíaca**, Buenos Aires. v. 9, n. 3, p.120-133, Maio. 2014.

PETER, G. et al. Germline VHL gene mutations in Hungarian families with von Hippel–Lindau disease and patients with apparently sporadic unilateral pheochromocytomas. **European Journal of Endocrinology**. Debrecen, v.161, n.1, p. 495-502, Jun. 2009.

PRADO, B. B. F. Influência dos hábitos de vida no desenvolvimento do câncer. **Ciência e Cultura**, São Paulo. v.66, n.1, p.21-24, Out/Dez. 2014.

SCHMID, S. et al. Management of von Hippel-Lindau Disease: An Interdisciplinary Review. **Oncology Research and Treatment**. St. Gallen, v.37, n.12, p.761-771, Dez. 2014.

SIQUEIRA, D. R. et al. Role of RET genetic variants in MEN2- associated pheochromocytoma. Clinical & translational endocrinology from around the globe. **European Journal of Endocrinology**, Porto Alegre. v.170, n.6, p. 821-828, Jun. 2014.

ULLRICH, M. et al. In Vivo Fluorescence Imaging and Urinary Monoamines as Surrogate Biomarkers of Disease Progression in a Mouse Modelo of Pheochromocytoma. **Endocrinology**. Dresden, v.155, n.11, p. 1-10. Nov.2014.

WONG, M. et al. Clinical and molecular characteristics of East Asian patients with von Hippel–Lindau syndrome. **Chinese Journal of Cancer**, Sagamihara. v.35, n.79, p.1-6, ago. 2016.

YAN, L. et al. A c.464T>A mutation in VHL gene in a Chinese family with VHL syndrome. **Journal of Neurooncology**. New York, v.2013, n.111, p.313-318, Nov. 2013.

YANG, M. et al. Pheochromocytoma of the pancreas: A report of three cases and a literature review. **Oncology Letters**. Sichuan, v.12, n.2, p.959-962, Jun. 2016.